

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-031487

(43)Date of publication of application : 03.02.1995

---

(51)Int.Cl.

C12P 7/62

---

(21)Application number : 05-195603

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 14.07.1993

(72)Inventor : YOKOYAMA MASAKO

---

## (54) SEPARATION OF BIO-POLYESTER FROM BIO-POLYESTER-CONTAINING MICROBIAL CELL

### (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for efficiently separating a bio-polyester in a granular state from microbial cells containing the bio-polyester.

CONSTITUTION: The aqueous suspension of bio-polyester-containing microorganisms is mixed with an alkali in an amount of 1mmol-1mol/kg microbial cells and subsequently heated at 40-100° C to separate the granular bio- polyester from the microorganisms.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.05.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 02.12.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-31487

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 P 7/62

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

7432-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-195603

(22) 出願日 平成5年(1993)7月14日

(71) 出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72) 発明者 横山 雅子

岡山県倉敷市潮通3丁目13番1 旭化成工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 清水 猛 (外2名)

(54) 【発明の名称】 バイオポリエステル含有菌体からのバイオポリエステルの分離方法

(57) 【要約】

【目的】 バイオポリエステル含有菌体から、バイオポリエステルを効率よく顆粒状で分離する方法を提供する。

【構成】 バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に1mmol/kg菌体～1mol/kg菌体の量のアルカリを添加し、40～100℃に加熱して、微生物から顆粒状のバイオポリエステルの分離する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に1 mmol/kg菌体～1 mol/kg菌体の量のアルカリを添加し、40～100℃に加熱して微生物から顆粒状のバイオポリエステルを分離することを特徴とするバイオポリエステル含有菌体からバイオポリエステルの分離方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生分解性を有するバイオポリエステルの菌体からバイオポリエステルの分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋立などによって処理されているが、これらの処理方法には、それぞれ地球の温暖化、埋め立て地の地盤弛緩等の問題がある。そのため、プラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際問題としてプラスチック廃棄物処理方法としては、焼却、埋立、リサイクルだけでは対応しきれず、自然環境中に放置されたままになるものも多い。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害物質とならないような生分解性プラスチックが注目されており、その開発が進められている。このようなプラスチックとして、特に、微生物が菌体内で生成するポリエステルは、自然界の炭素循環プロセスに組み込まれて生態系の安定化がなされると予想されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能である。

【0003】 しかし、このポリエステルのプラスチックとして使用するためには、微生物の菌体内から分離して取り出す必要がある。バイオポリエステル含有微生物からバイオポリエステルの得る方法として、クロロホルムをはじめとする有機溶媒による抽出法、次亜塩素酸ソーダ(Williamson, D. H., and Wilkinson, J. F. (1958), J. Gen. Microbiol. 19, 198-203.) またはリゾチームを用いて菌体を溶解し、残存したポリマーを顆粒として回収する方法が知られている。その他、リゾチーム以外の特定の酵素による菌体の溶解によってポリマーを回収する方法(特開昭60-145097)、100℃超の高圧の水蒸気等の圧力の開放により菌体を破壊し、菌体破片屑とポリマーとに分離する方法(特開昭57-174094)等もある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、クロロホルム等による溶媒抽出法は、当該抽出溶媒だけでなく、再沈澱のための貧溶媒も大量に必要とする。したがって、溶媒を各々再利用しようとするれば、2種の溶媒を分離する

ことが必要である。さらに、一般に溶媒抽出に先だって菌体全体を完全に乾燥することが必要なため、多大の熱エネルギーを要することにもなるので、バイオポリエステルの工業的に生産するためには、多くのプロセス用設備やエネルギーが必要となり、事実上不利である。次亜塩素酸ソーダで処理した場合は、溶媒抽出法の欠点を回避することはできるが、一方、ポリエステルの分子量低下が起こり(J. A. Remsay, E. Berger, B. A. Remsay and C. Chavarie (1990), J. Biotechnology Techniques 4, 4, 221-226)、ポリマーの品質に問題が生じる。リゾチームのような酵素は、少量の実験的利用には効果的であるが、大量に確保するのが困難なため、バイオポリエステルの量産には適切でない。特開昭60-145097の酵素法では、酵素処理前後の操作が多段階になり、量産のためには、なお改善の余地が大きい。特開昭57-174094の圧力の解放による方法は、得られたポリエステルの純度や収量が未記載のため、効果が不明である。本発明は、有機溶媒を用いずに水性媒体中、1ないし2気圧の低圧力で100℃未満に加熱することにより、バイオポリエステルを含む微生物からバイオポリエステルの分離する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、バイオポリエステル含有微生物の水性懸濁液に1 mmol/kg菌体～1 mol/kg菌体、好ましくは2.5 mmol/kg菌体～200 mmol/kg菌体、特に好ましくは50 mmol/kg菌体～200 mmol/kg菌体の量のアルカリを添加し、40～100℃の範囲で加熱して、微生物から顆粒状のバイオポリエステルの分離することを特徴とするバイオポリエステルの分離方法に関する。本発明に用いる微生物は、細胞内にバイオポリエステルの蓄積しているバクテリア(細菌)である。例えば、アルカリゲネス属(Alcaligenes)の菌、A. lipolytica AK201(特開平5-64592)、A. eutrophus、A. latus等、シュウドモナス属(Pseudomonas)、バシラス属(Bacillus)、アゾバクター属(Azotobacter)、ノカルディア属(Nocardia)等の菌株が示されるが、その種類に限定されるものではない。

【0006】 ここで、バイオポリエステルとは、ポリ-D-3-ヒドロキシブチレート〔以下、P(3HB)と略称する〕をはじめとするポリヒドロキシアルカノエート〔以下、P(HA)と略称する〕と称される微生物産生ポリエステルを指す。P(3HB)以外の代表的な例として、3HBとD-3-ヒドロキシバレレート(3HV)との共重合体〔P. A. Holmes et al (IC1), Eur. Pat. Appl. 005245

9 (1981)」、3HBと4-ヒドロキシブチレート (4HB)との共重合体〔Y. Doi et al., *Macromolecules*, 21, 2722 (1988)〕が挙げられる。細胞内に蓄積しているバイオポリエステルは、微小な顆粒として存在することが知られている。処理される細胞内のバイオポリエステル含有率 (以下、ポリマー含有率という) は、高いほうが好ましい。一般に、乾燥菌体としてポリマー含有率が20重量%以上がよい。アルカリ添加量、処理時間、分離操作の効率、分離ポリマーの純度等を考慮すると、50重量% 10 以上のポリマー含有率が特に好ましい。

【0007】水性懸濁液とは、培養終了後の培養懸濁液そのもの、または培養液から遠心等で分離した菌体を水に懸濁させたものを指す。使用するアルカリとしては、NaOHを始めとしてLiOH、KOH等を含めたアルカリ金属の水酸化物、あるいはNH<sub>4</sub>OHが用いられる。アルカリの使用量は1mmol/kg菌体～1mol/kg菌体、好ましくは2.5mmol/kg菌体～200mmol/kg菌体、特に好ましくは50mmol/kg菌体～200mmol/kg菌体で、これを微生物の水性懸濁液に添加する。アルカリを添加後は、水性懸濁液を40～100℃、好ましくは60～100℃に加熱する。その温度での加熱時間は0.5～4hr、好ましくは1～2hrがよい。この時、攪拌や振とうにより、系内を均一化することは好ましい。以上の操作は、一般に1ないし2気圧の低下下で行う。

【0008】このような操作を行うことにより、菌体を破壊し、バイオポリエステルを顆粒状で菌体から分離できる。菌体壁が破壊されると、核酸のような水溶性の高分子物質が細胞外に溶出するために、該懸濁液の粘度が 30 上昇する。そのために、この一連の処理操作で使用する該懸濁液の菌体濃度は、その後の遠心操作、濾過操作等の分離操作の効率を考慮すると、乾燥菌体換算で100g菌体/l以下がよい。好ましくは30～100g菌体/lである。本発明により、アルカリ添加を行った微生物の水性懸濁液を加熱することにより、菌体壁を破壊し、バイオポリエステルを顆粒状で分離できる。

【0009】

【実施例】本実施例で用いた微生物は、アルカリゲネス\*

\*属に属する微生物アルカリゲネス・リポリティカ (*Alcaligenes lipolytica*) AK201 (特開平5-64592)で、培養後、P(3HB)を約50wt%含有している菌を遠心(8000rpm, 10min. 遠心分離機はKUBOTA製6810使用)によって培養液から分離後、ペースト状菌体に水を加えて40g菌体/lの水性懸濁液とした。この水性懸濁液を用いて、以下に示す実施例1, 2および比較例1を行った。

【0010】実施例1, 2および比較例1の操作で得たP(3HB)は、純度を調べるためにガスクロマトグラフィー、分子量分布の決定にゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)を用いて分析を行った。なお、ガスクロマトグラフィーには、実施例1, 2および比較例1で得られた沈澱物を乾燥(105℃, 24hr)した後、メタノール/硫酸でメタノリシスして菌体内ポリエステルをモノマーのメチルエステルとしたものを分析して、ポリマー含有率を求めた。これは、〔H. Brandl et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 11, 49-55 (1989)〕に示される方法に従った。GPCは、試料(約100mg)中のポリエステルを熱クロロホルム150mlで抽出後、溶液を濃縮してヘキサンを加えて再沈し、沈澱を濾過、真空乾燥(2hr)して10mg/10mlのクロロホルム溶液にして測定した。

【0011】(実施例1) 4.0mMとなるように0.1MのNaOH水溶液を加え、P(3HB)含有菌体の該懸濁液100mlを作成した。該懸濁液を密閉にした容器中で攪拌(100rpm)しながら80℃に加熱し、1hr攪拌を続けた。処理後の水性懸濁液を遠心分離(2700rpm, 10min)して沈澱物を得た。(実施例2) 8.0mMとなるように0.1MのNaOH水溶液を該懸濁液に添加するように変える以外は、実施例1と同様に操作した。

(比較例1) 本例では、NaOH水溶液を添加しないこと以外は、実施例1と同様に操作した。

実施例1, 2および比較例1の条件を表1に示す。

【0012】

【表1】

|      | アルカリ量  | 加熱温度      |
|------|--------|-----------|
| 実施例1 | 4.0 mM | 80℃ (1hr) |
| 実施例2 | 8.0 mM | 80℃ (1hr) |
| 比較例1 | 無      | 80℃ (1hr) |

実施例, 比較例について、ガスクロマトグラフィー、GPCより求めたポリマー含有率、分子量の結果を表2に示す。

【0013】

【表2】

|       | 5      |                    | 6                  |       |
|-------|--------|--------------------|--------------------|-------|
|       | ポリマー純度 | Mn                 | Mw                 | Mw/Mn |
| 実施例 1 | 75.1 % | $1.96 \times 10^5$ | $3.53 \times 10^5$ | 1.80  |
| 実施例 2 | 8.05 % | $1.98 \times 10^5$ | $3.60 \times 10^5$ | 1.82  |
| 比較例 1 | 60.7 % | $1.79 \times 10^5$ | $3.36 \times 10^5$ | 1.88  |

【0014】

【発明の効果】本発明により、従来の各方法の欠点を克服した新しい分離法を開発した。すなわち、有機溶媒を用いなくて、水性媒体中で少量のアルカリ添加、100

℃以下の穏やかな加熱（1ないし2気圧の低圧下）を行う比較的単純な方法で、バイオポリエステルを含む微生物からバイオポリエステルを分離できた。